

FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

N°

1

Titre de la Thèse

**Le Gluconate de Calcium
et ses solutés injectables**



THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine Générale et Coloniale
et de Pharmacie de Marseille

Le Février 1947

Nom du Candidat Albert ROUX

Date et lieu de naissance du Candidat le 9 Avril 1917 à Veynes (H.-A.)

Titre du Candidat { Ancien Interne des Hopitaux de Marseille
Ancien Interne des Hopitaux de Grenoble
Pharmacien en Chef des Hopitaux de Grenoble

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examineurs { MM^{rs} les Professeurs
de la Thèse { VIGNOLI, Président
MERCIER
ARNOUX
DELPHAUT (agrégé) } assesseurs

Nom de l'Editeur : Raoul BESSOUD

FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

N^o

Titre de la Thèse

Le Gluconate de Calcium
et ses solutés injectables



THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine Générale et Coloniale
et de Pharmacie de Marseille

Le Février 1947

Nom du Candidat **Albert ROUX**

Date et lieu de naissance du Candidat **le 9 Avril 1917 à Veynes (H.-A.)**

Titre du Candidat	{	Ancien Interne des Hopitaux de Marseille
		Ancien Interne des Hopitaux de Grenoble
		Pharmacien en Chef des Hopitaux de Grenoble

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examineurs de la Thèse	{	MM ^{rs} les Professeurs	{	assesseurs
		VIGNOLI, Président		
		MERCIER		
		ARNOUX		
		DELPHAUT (agrégé)		

Nom de l'Editeur : **Raoul BESSOUD**



PERSONNEL ENSEIGNANT
DE LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Doyen : L. CORNIL

Assesseur : J. ROCHE

Doyen honoraire : L. IMBERT

Professeurs honoraires : MM. MOITESSIER,
GAUJOUX, COTTE, AUBARET, AUDIBERT, JOYEUX

Chargé de Cours honoraire : M. TIAN

Secrétaire : J. COMTE

Bibliothécaire : Mme PEROL

Professeurs

Anatomie	SALMON
Anatomie Pathologique et Médecine Expérimentale	CORNIL
Bactériologie	POURSINES
Chimie Analytique et Hydrologie	RIMATTEI
Chimie Médicale	ROCHE
Clinique Chirurgicale	FIOLE
Clinique Chirurgicale	MOIROUD
Clinique Exotique	HECKENROTH
Clinique des Maladies Nerveuses	ROGER
Clinique Médicale	OLMER
Clinique Médicale	MATTEI
Clinique des maladies des voies digestives et de la nutrition	MONGES
Clinique Médicale Infantile	VAYSSIÈRE
Clinique Médicale Thérapeutique	POINSO
Clinique Obstétricale	GIRAUD
Clinique Ophtalmologique	JAYLE
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique	BREMOND
Clinique Urologique	CHAUVIN
Histoire Naturelle	GABRIEL
Histologie	ROMIEU
Hygiène Générale et Coloniale	VIOLE
Médecine Légale	MOSINGER
Parasitologie	SAUTET
Pathologie Chirurgicale	CARCASSONNE
Pharmacodynamie et Matière Médicale	F. MERCIER
Pharmacie	VIGNOLI
Physiologie	MORIN
Physique	N...
Professeur sans Chaire	BELTRAMI
Professeur sans Chaire	DUBOULOZ
Professeur sans Chaire	BALANSARD
Professeur sans Chaire	J. PIERI
Professeur sans Chaire	ARNOUX

Chargés de Cours

Clinique Dermatologique	VIGNE
Clinique de la Tuberculose	BERTHIER

Agrégés en exercice

BRAHIC	DERRIEN
FIGARELLA	GRISOLI
	HENRY
AUDIER	JOUBE
CHOSSON	LAMY
DELPHAUT	LENA
DOR	J. OLMER
IMBERT	PICARD
PAILLAS	RANQUE
RECORDIER	VAGUE

Chargé des fonctions d'agrégé

Physiologie	DONNET
-------------------	--------

Enseignements complémentaires

Anatomie Descriptive et Topographi-	
que	GRISOLI
Anatomie Générale	JULLIEN
Chimie Minérale	ARNOUX
Chimie Organique	DUMAZERT
Clinique Chirurgicale Infantile	IMBERT
Cryptogamie	PELLISSIER
Embryologie	ROMIEU
Gynécologie	FIGARELLA
Hygiène et Clinique de la 1 ^{re} Enfance	BERNARD
Médecine Opératoire	LENA
Neuro-Chirurgie	PAILLAS
Neuro-Psychiâtrie Infantile	CREMIEUX
Obstétrique	CHOSSON
Pathologie Chirurgicale	LAMY
Pathologie des Vieillards	RAYBAUD
Parmacodynamie (Pharmacie)	DELPHAUT
Propédeutique Chirurgicale	LUCCIONI
Psychiâtrie	ALLIEZ
Radiologie Clinique	MATTEI
Toxicologie	GUILLLOT

A TOUS LES MIENS

A la mémoire de mes Grands-Parents

A mon père, à ma mère

Qui ont été et demeurent pour moi un exemple de probité et de labeur incessant.

Puissent-ils trouver dans ce travail une modeste récompense à leur abnégation et à leurs sacrifices.

A mon frère, à ma belle-sœur et à tous les siens

En témoignage de ma profonde et sincère affection.

A MES AMIS

A Madame Hélène FAURE

Qui fut mon chef de service aux Hôpitaux de Grenoble.

Au Docteur René FAURE

A leurs enfants

A qui je suis heureux d'exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance.

A la mémoire de Marceau PINET

Interne des Hôpitaux de Grenoble dont le travail et la conscience furent admirables.

A mon camarade d'études Jo GLÉNAT

A MON PRESIDENT DE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur VIGNOLI

Professeur de Pharmacie à la Faculté
de Médecine et de Pharmacie de Mar-
seille.

Avec ma respectueuse gratitude.

A MES JUGES

Monsieur le Professeur MERCIER
Professeur de Matière Médicale et de
Pharmacodynamie.

Monsieur le Professeur ARNOUX

Monsieur le Professeur agrégé DELPHAUT

A MES MAITRES de la Faculté mixte de Médecine
Générale et Coloniale et de Pharmacie de Mar-
seille.

A MES MAITRES de l'Ecole Préparatoire de Médecine
et Pharmacie de Grenoble.

S'il est un devoir particulièrement agréable à remplir, c'est bien celui que nous accomplissons en ce moment. En remerciant tous ceux qui nous ont guidé au cours de notre formation intellectuelle professionnelle et morale nous revivons par la pensée des heures parmi les meilleures de notre vie.

Notre reconnaissance va d'abord à ceux qui nous ont donné le premier bagage scientifique et en particulier

à Madame et à Monsieur Louis MICHEL

Instituteurs publics honoraires qui n'ont cessé de nous témoigner leur sympathie. Nous sommes heureux de les remercier pour leur dévouement à notre égard ;

au Professeur agrégé A. FABRE

Dont la forte personnalité nous a heureusement impressionné ;

à la mémoire du Professeur Pierre PÉGUY, agrégé
ès lettres.

Notre grand aîné qui sut porter dignement son nom sans cesse plus grand ;

à la mémoire du chanoine Louis ROUX

Dont la conscience et l'esprit de devoir demeureront pour nous un lumineux modèle.

Nous assurons de toute notre gratitude notre excellent
Maître de Stage, Monsieur Alfred PAGET

Ancien Interne des Hôpitaux de Lyon.
Conseiller de la République.

L'année que nous avons passé dans son officine est celle dont nous conservons le meilleur souvenir, grâce au milieu si sympathique que nous y avons trouvé.

Mais c'est à l'Ecole préparatoire de Médecine et de Pharmacie de Grenoble que nous avons acquis l'essentiel de nos connaissances professionnelles.

C'est tout d'abord à Mademoiselle BARRIER

Professeur de Pharmacie, que nous dirons notre respectueuse reconnaissance. Elle n'a cessé de nous donner des preuves de sa grande sympathie. Par la clarté, la précision et la méthode de son enseignement, nous avons acquis des connaissances qui nous ont permis d'achever nos études, dans les meilleures conditions. Grâce à elle nous avons compris et apprécié l'importance de l'ordre et de la méthode dans l'étude d'une part, et l'exercice de notre profession d'autre part et nous sommes heureux de l'en remercier.

à Monsieur le Professeur LESTRA

à Monsieur CŒUR

et à Monsieur MASSOT

Nous disons notre sincère gratitude
ainsi qu'à

Monsieur le Docteur OFFNER

et à Messieurs VAILLANT et ABONNENC.

Enfin nous exprimons à :

Monsieur le Professeur CARRAZ

Toute notre reconnaissance.

Nous avons eu le plaisir de trouver à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marseille, des Maîtres qui nous témoignèrent en toute circonstance leur dévouement.

Nous sommes heureux de remercier tout particulièrement :

Monsieur le Professeur VIGNOLI

Qui nous a fait l'honneur d'accepter
la Présidence de notre Jury de Thèse,

Monsieur le Professeur ROCHE

Un des Maîtres de la génération actuelle des biologistes Français dont nous sommes fier d'avoir été l'élève.

Monsieur le Professeur BALANSARD

Dont nous n'oublierons jamais l'intérêt qu'il nous témoigna en maintes circonstances,

Monsieur le Professeur agrégé DELPHAUT

Qui nous a si aimablement aidé dans ce travail,

Monsieur le Professeur ARNOUX

Notre pharmacien, chef à l'Hôtel-Dieu qui ne cessa de nous encourager, fut toujours pour nous et est demeuré un guide éclairé et bienveillant à qui nous disons notre respectueuse sympathie et notre sincère reconnaissance.

PLAN

Introduction :

- Rôle physiologique de l'ion calcium.
- Avantages du gluconate de calcium en thérapeutique humaine.
- Caractères du gluconate de calcium.
- Premiers essais. — Purification.

Première partie :

- Procédés de préparation industrielle du gluconate de calcium.
- A) Voie d'oxydation chimique directe.
- B) Voie d'oxydation électrolytique.
- C) Voie d'oxydation biochimique.
- Remarques et conclusions.

Deuxième partie :

- Essais sur animaux.
- Essais physiologiques sur le chien avec :
 - Gluconate de calcium pur.
 - Gluconate de calcium purifié.
 - Gluconate de calcium impur.
- Essais toxicologiques sur le poisson.
- Essais toxicologiques sur la grenouille.
- Remarques et conclusions.

Troisième partie :

- Soluté injectable de gluconate de calcium.
- Soluté et stabilisation.
- Etude critique des stabilisants.
- Essai sans stabilisant.
- Remarques et conclusions.

Conclusions.

INTRODUCTION

Au cours de notre séjour comme Interne à la Pharmacie de l'Hôpital Civil de Grenoble, d'abord, à la Pharmacie de l'Hôtel-Dieu de Marseille, ensuite, nous avons assisté à l'essor sans cesse grandissant de la calcithérapie.

Le calcium est en effet, non seulement un élément abondamment répandu dans le régime minéral, le règne végétal et le règne animal, mais c'est aussi un constituant essentiel de l'organisme humain. L'ion calcium a deux rôles principaux en physiologie humaine. Il est indispensable à la vie cellulaire en raison de son pouvoir antagoniste et régulateur vis-à-vis des ions K et Na. Il est nécessaire à la contraction de la musculature striée et du myocarde dont il augmente la sensibilité vis-à-vis des glucosides cardiotoniques, ainsi qu'au phénomène de la phagocytose. L'ion Ca exerce de plus une action antagoniste de celle des ions Na et K en entretenant l'excitabilité nerveuse. D'autre part, donnant avec les acides carbonique et phosphorique des combinaisons peu solubles il contribue à la formation du tissu osseux de soutien. Le système osseux outre son rôle de soutien est une riche réserve calcique à laquelle l'organisme fait appel pour couvrir ses besoins et qui se complète à nouveau lorsque l'apport en sel de Ca redevient abondant et que le métabolisme calcique retrouve son équilibre.

Régulation du métabolisme calcique : Les régulateurs chimiques sont le sodium dont un excès ou le phosphore dont une carence donnent la décalcification. Le rôle de l'équilibre acide base est très important pour le maintien de l'équilibre calcique.

L'hormone parathyroïdienne joue un rôle primordial dans l'équilibre de la calcémie.

Les Vitamines D sont le facteur physiologique de la fixation du Ca. Leur présence est indispensable à l'ossification normale en même temps que le P. et le Ca. L'organisme normal a besoin d'un apport régulier de Ca et les régimes riches en protides donc acidifiants favorisent

l'élimination du Ca par la voie intestinale. L'enfant a besoin d'une ration Ca P. équilibrée. Le lait la lui fournit normalement.

L'ion Ca est indispensable à la coagulation du sang, il intervient pour atténuer les inflammations et les œdèmes locaux (urticaire).

Le sel de calcium le plus employé est le gluconate. C'est actuellement le seul produit calcique injectable employé sur une grande échelle et voici pourquoi selon Heinrich Pincass : « A la place du chlorure de calcium on emploie toujours plus le gluconate par suite de la résorption meilleure du calcium. Des essais ont démontré que la toxicité s'atténue dans l'ordre suivant (le degré d'acidité restant constant) : acide formique, acide acétique, acide citrique, acide gluconique, acide lactique, acide tartrique. A molarité égale (m 4 molécules intra-veineuse) l'acide gluconique est en dernière place, mais si l'on considère la formation d'hématine en troisième place. Vu sa mauvaise solubilité dans les liquides, la formation d'hématine se fait relativement lentement. »

La grande vogue du gluconate de calcium surtout sous forme de soluté injectable est loin de s'être ralentie.

Indications thérapeutiques du gluconate de calcium. —

Elles découlent de l'activité physiologique de l'ion Ca :

Etat de décalcification : Ostéomalacies, maladie de Recklinghausen. Affections pleuro-pulmonaires - tuberculose pulmonaire ; traitement de fond d'une part, des hémoptisies de l'autre.

Etats tétaniques et spasmophiliques : action sédatrice et modératrice ;

maladies infectieuses : le Ca est antiinflammatoire, il active la phagocytose ;

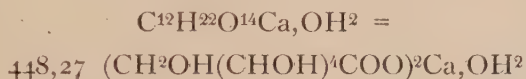
hémorragies de toute nature : le Ca est indispensable à la formation de la thrombine.

états allergiques et anaphylactiques : le Ca est désensibilisant ;

états de choc - dermatoses : le Ca est désensibilisant.

Les raisons qui nous ont poussé à entreprendre une étude sur le gluconate de calcium sont d'une part les difficultés éprouvées depuis toujours pour solubiliser ce corps à la concentration de 10 % et conserver ce soluté, d'autre part les accidents graves constatés au cours de l'hiver 1944-45 à l'emploi de soluté injectable de gluconate de calcium par voie intra-veineuse, accidents dont certains ont été mortels, comme c'est le cas dans les Hôpitaux de Paris, suivant *la Presse Médicale* du 3 février 1945.

Caractères du gluconate de calcium : Pharmacopée française. T. II, p. 139, éd. 1937.



Composition analytique :

Calcium	8,94
Acide Gluconique	87,49
Eau	4,02
Oxyde de Calcium	12,51

Caractères : Poudre cristalline blanche, sans odeur ni saveur.

Solubilité :

Eau	30
Eau à 100°	5
Alcool	Insoluble
Ether éthylique	Insoluble

La solution aqueuse à 2 pour cent est neutre au tournesol et donne les réactions des sels de calcium.

Dissolvez cinquante centigrammes de gluconate de calcium dans cinq centimètres cubes d'eau, ajoutez un centimètre cube de phenylhydrazine et 0 cm 365 d'acide acétique et chauffez le mélange au bain-marie pendant trente minutes : laissez refroidir, il se produira des cristaux de la phenylhydrazide de l'acide gluconique. Recueillez ces cristaux sur un filtre et faites-les dissoudre dans la quantité suffisante d'eau distillée chaude, agitez le liquide encore chaud avec cinquante centigrammes de

charbon activé et filtrez le liquide chaud ; laissez refroidir, recueillez les cristaux et séchez-les à basse température. Le point de fusion de ces cristaux doit être compris entre 200 et 202°.

Sur une solution acétique de gluconate de calcium, la Pharmacopée fait rechercher les chlorures, les sulfates, les métaux lourds. Dans les conditions de dilution prescrites l'essai doit être négatif.

L'absence d'arsenic est mise en évidence par le réactif à l'acide hypophosphoreux de Bougault dans des conditions déterminées. L'absence de glucose et de saccharose est de même mise en évidence avec la liqueur de Fehling.

Le dosage se fait pondéralement sous forme de sulfate de calcium et est exprimé en oxyde de calcium. Le produit officinal doit contenir au minimum 12,4 et au maximum 12,8 pour cent d'oxyde de calcium (CaO).

REMARQUES :

Le gluconate de calcium pur est un corps parfaitement blanc, c'est là un caractère organoleptique très important car on trouve dans le commerce des échantillons de gluconate plus ou moins jaunes donnant des solutions aqueuses colorées. Ainsi que nous allons le voir ce sont ces produits qui donnent des accidents lors de l'emploi par voie intra-veineuse. Les solutions aqueuses (2 gr. de gluconate de calcium dans 10 cc d'eau distillée bouillante, par exemple) doivent être limpides et incolores.

En ce qui concerne la solubilité du produit, s'il est exact qu'à la température ordinaire il est soluble dans 30 parties d'eau, à 100° il est soluble dans 2,5 parties d'eau et non dans 5 comme l'indique la Pharmacopée.

Enfin la méthode de dosage pondéral adoptée par la Pharmacopée est assez longue. Nous avons employé la méthode proposée par Lucas et mentionnée dans le traité de Pharmacie Chimique de Lebeau et Courtois, méthode volumétrique rapide qui nous a donné satisfaction : une solution aqueuse de gluconate de calcium en milieu sulfurique est oxydée à chaud par une solution titrée de

permanganate de potasse ajoutée jusqu'à coloration rose persistante :

1 cc de MnO_4K N/10 = 0 gr. 001886 de gluconate de calcium.

Le dosage peut aussi être effectué au polarimètre. Cette méthode est assez délicate et peu précise. En l'expérimentant nous nous sommes heurtés aux difficultés suivantes :

1° Déviation dextrogyre très faible, à la concentration

$$10\% = 1^{\circ}96$$

$$5\% = 0^{\circ}98$$

2° Du fait de cette faible déviation il faut employer des solutions concentrées. Une solution à 10 % de gluconate de calcium est saturée, elle devient rapidement translucide et ne permet pas un dosage précis à moins d'opérer très rapidement.

L'activité optique du gluconate de calcium peut être accrue par addition d'azotate de bismuth, d'acétate d'urane ou mieux de molybdate d'ammonium en milieu acétique. Le pouvoir rotatoire spécifique passe alors de $6^{\circ}66$ (Fischer) à 366° (Bonnet et Clark) pour une solution à 10 % de gluconate de calcium.

On peut enfin faire un dosage volumétrique de gluconate par précipitation sous forme d'oxalate de calcium de l'ion Ca du gluconate et titrage de l'acide oxalique contenu dans le précipité avec une solution titrée de permanganate de potassium en opérant en milieu sulfurique à chaud.

C'est sous forme de solution aqueuse à 10 % que le gluconate de calcium est généralement employé en thérapeutique. A cette concentration la solution est sursaturée donc instable et cristallise facilement. Divers procédés ont été proposés pour stabiliser ces solutions. Nous aurons l'occasion de les examiner par la suite.

Nos premières recherches commencèrent au mois de mai 1944. A cette époque les solutés injectables de gluconate de calcium se raréfièrent considérablement sur le marché et peu à peu apparurent des solutés fabriqués

par des laboratoires plus ou moins spécialisés. C'est avec ces solutés que des accidents de choc furent constatés à l'injection intra-veineuse. A ce moment nous avons préparé un soluté avec du gluconate de calcium de fabrication antérieure à 1940. Afin d'éviter toute cause d'erreur nous nous sommes toujours servi d'ampoules en verre absolument neutre et provenant du même lot de fabrication. Ce soluté était parfaitement toléré et ne donnait aucun accident à l'injection.

Ensuite nous avons employé un gluconate de calcium réputé pur mais fabriqué en 1944. Les essais de la Pharmacopée française effectués sur ce produit ne nous ayant pas permis de déceler d'impuretés chimiques nous avons préparé un soluté injectable avec ce gluconate. Son administration par voie intra-veineuse fut suivie d'accidents de choc : bouffées de chaleur, tremblement, syncope hyperthermie allant jusqu'à $41^{\circ}5$ pendant plusieurs heures. Nous avons alors préparé une solution aqueuse concentrée avec 10 gr. de ce gluconate de calcium et 25 cm^3 d'eau distillée : nous obtenons un liquide fortement teinté en jaune. Un examen direct des cristaux de gluconate de calcium nous fit découvrir des particules teintées en jaune. Pensant qu'il s'agissait là d'une impureté provenant probablement du glucose massé seul employé dans l'industrie pour préparer le gluconate de calcium, nous avons entrepris une purification du produit par recristallisation.

Purification du Gluconate de Calcium.

Nous avons effectué trois cristallisations successives en milieu aqueux afin d'éliminer totalement l'impureté présumée soluble dans l'eau.

Nous dissolvons à l'ébullition 265 gr. de gluconate de calcium dans 475 gr. d'eau distillée. Après filtration du soluté chaud, nous obtenons un liquide teinté en jaune. Nous amorçons la cristallisation au moyen de cristaux de gluconate de calcium pur et non choquant et la solution est mise 12 heures à la glacière. Nous obtenons une masse pâteuse qui renferme les cristaux de

gluconate de calcium et l'eau-mère de cristallisation. Pour éliminer celle-ci nous exprimons cette masse au moyen d'une grosse presse d'officine.

Nous obtenons un gâteau blanc de gluconate de calcium et un liquide coloré en jaune.

Nous redissolvons le gluconate de calcium obtenu et répétons trois fois l'opération. A la troisième cristallisation le liquide d'expression est absolument incolore et les cristaux de gluconate de calcium sont parfaitement blancs.

Nous obtenons 110 gr. de gluconate de calcium purifié. Les quantités perdues d'ailleurs récupérables par concentration des eaux-mères de cristallisation furent à leur tour purifiées.

Avec ces 110 gr. de gluconate de calcium purifié nous avons préparé un soluté injectable qui s'est montré d'excellente qualité et ne nous a procuré aucun ennui à l'emploi par voie intra-veineuse.

REMARQUE :

La perte la plus importante s'étant produite lors de la troisième cristallisation nous avons pensé qu'une série de solubilisations par chauffage augmente la solubilité du gluconate de calcium dans l'eau et ce fait sera mis à profit ultérieurement pour préparer les solutés injectables.

Deuxième essai. — Nous faisons dissoudre 35 gr. de gluconate de calcium, réputé injectable mais donnant des accidents, dans 75 gr. d'eau distillée à l'ébullition. Après filtration cette solution colorée en jaune est mise dans un cristalliseur et est concentrée au moyen d'une source modérée de chaleur (60-70°).

Après évaporation totale du solvant nous obtenons des cristaux de gluconate de calcium qui sont colorés en jaune marron en surface et cela surtout au voisinage des parois du récipient. En grattant avec un agitateur la partie superficielle de la masse cristalline nous éliminons totalement les cristaux teints en jaune et le résidu blanc est employé à la préparation d'un soluté injectable.

Ce soluté ne donne aucun accident à l'emploi pour injection intra-veineuse chez plusieurs personnes.

Avec les cristaux de surface teintés en jaune nous faisons :

1° des essais de solubilité de l'impureté colorée ; elle est soluble dans l'eau distillée à froid, l'alcool éthylique à 95° à froid, l'éther officinal à froid, ceci nous donne autant de possibilité de purification, le gluconate de calcium étant peu soluble dans l'eau distillée à froid et presque insoluble dans l'alcool éthylique à 95° et l'éther officinal ;

2° une solution aqueuse à 10 % qui nous a servi à effectuer des essais de toxicité sur lapin — cet animal étant le seul dont nous ayons pu disposer à ce moment-là. Des injections faites dans la veine marginale de l'oreille durant trois jours consécutifs n'ont nullement incommodé l'animal. Les injections ont été pratiquées à dose croissante : 1 cc³ par kilogramme d'animal — 1 cm³/5, puis 2 cm³ par kilo.

Nous avons répété cinq fois l'essai de purification et nous avons obtenu les résultats indiqués ci-dessous :

TABLEAU N° I

<i>Gluconate de Ca</i>	<i>Eau distillée</i>	<i>Gluconate de Ca purifié non choquant</i>
265 gr.	475 gr.	110 gr.
35 gr.	75 gr.	15 gr.
445 gr.	1050 gr.	195 gr.
500 gr.	1200 gr.	223 gr.
29 gr.	50 gr.	13 gr.

D'après ce tableau nous pouvons dire que le gluconate de calcium est soluble à l'ébullition dans un peu plus de deux fois son poids d'eau distillée, cette solution étant évidemment sursaturée et laissant très rapidement cristalliser le gluconate de calcium.

Le gluconate de calcium ainsi purifié ayant donné des accidents avant sa purification — accidents constatés par nous-même, — constatés par de nombreux médecins employant une spécialité préparée avec ce gluconate réputé injectable nous pouvons affirmer que ceux-ci sont dus à une impureté du produit. Avec un laboratoire français spécialisé dans la confection de solutés injectables de gluconate de calcium nous disons donc : « Les gluconates de calcium obtenus par des procédés industriels sont souvent choquants en injection intra-veineuse. Aussi est-il nécessaire de les épurer par différents procédés de recristallisation dont chaque fabricant garde la technique. »

Ce sera là, d'une part, notre première conclusion, d'importance primordiale au point de vue pratique et, d'autre part, une raison impérative pour étudier les procédés de fabrication industrielle du gluconate de calcium et voir celui donnant le produit de meilleure qualité.

PREPARATION DU GLUCONATE DE CALCIUM

Il existe trois acides gluconiques :

acide d gluconique, acide l gluconique, acide gluconique racémique appartenant au groupe des acides pentaoxymonocarboniques.

On peut obtenir ces acides :

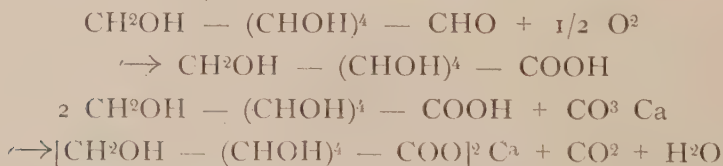
1° par action de l'acide cyanhydrique sur les aldopentoses et hydratation des nitriles formés ;

2° par oxydation des alcools ou des aldoses correspondants.

L'acide d gluconique se prépare par oxydation du glucose. Son sel de calcium cristallisant avec une molécule d'eau est le gluconate de calcium officinal.

Fabrication du gluconate de calcium.

Le principe de fabrication est très simple en théorie, on oxyde le glucose en acide gluconique et on transforme ce dernier en gluconate à l'aide d'un sel de calcium, en général, le carbonate de calcium.



L'exécution industrielle de l'oxydation rencontre de multiples difficultés parce que l'oxydation du glucose ne s'arrête, la plupart du temps, pas à l'acide gluconique mais atteint d'autres degrés d'oxydation pouvant aller jusqu'à l'acide carbonique. Pour obtenir un produit pur il est nécessaire de procéder à des recristallisations, ce qui conduit à des pertes notables. De nombreux brevets ont été pris et nous examinerons successivement les procédés d'oxydation par voie chimique, par voie électrolytique et par voie biochimique.

METHODES CHIMIQUES

L'oxydation est faite à l'aide du brome, de l'iode ou leurs dérivés oxygénés ou à l'aide de l'oxyde rouge de mercure.

Le procédé suivant, d'origine allemande, emploie le brome comme oxydant. On dissout une partie de glucose dans cinq parties d'eau et on agite la solution pendant plusieurs heures avec une partie de brome. Pour parachever l'oxydation on laisse ce mélange un ou deux jours en chambre chaude. Le liquide est soumis ensuite à la distillation en vase clos à une température de 60° jusqu'à ce que le résidu soit incolore. Dans ce résidu on détermine la quantité d'acide bromhydrique formé lors de l'oxydation et on ajoute la quantité nécessaire de bicarbonate de soude pour le neutraliser. Ensuite on chauffe le mélange et on ajoute un excès de carbonate de calcium pour neutraliser l'acide gluconique, on filtre et le filtrat restera deux ou trois jours en glacière permettant la séparation du gluconate de calcium. Pour obtenir un corps pur on devra effectuer de multiples recristallisations et à cause de cela les pertes sont très élevées. Nous avons expérimenté ce procédé et malgré un contact de huit jours à la température de 25-30° nous n'avons pu oxyder la totalité du sucre réducteur mis en œuvre. C'est donc une méthode peu intéressante.

Le procédé français fait agir du brome naissant préparé par action d'un chlorate sur un bromure en milieu acide. Il y a économie de brome qui est constamment formé à partir de l'acide bromhydrique. Cette réaction de formation du brome est catalysée par le vanadium, le tantale, le chrome, le cobalt, le nickel, le palladium, l'osmium, le platine ou leurs sels. Le brevet donne l'exemple d'exécution suivant :

100 kg de glucose sont dissous dans 100 litres d'eau. On ajoute 10 kg de bromure de potassium, 10 kg d'acide chlorhydrique à 30 %, 23 kg 6 de chlorate de sodium et 0 kg 03 de nitrate de cobalt. Le tout bien mélangé sera chauffé de 40 à 50°. Après 4 à 5 heures, la réaction sera terminée alors qu'à température ordinaire elle durerait

12 heures. On neutralise avec du carbonate de calcium, l'acide gluconique est transformée en gluconate de calcium peu soluble qui cristallise. On purifie ce corps par recristallisations successives.

On peut également effectuer l'oxydation au moyen d'hypobromites ou d'hypoiodites. En employant des hypochlorites l'oxydation du glucose conduit jusqu'à l'acide exalique ou l'acide carbonique, ce qui rend presque impossible l'isolement du gluconate de calcium. Mais si l'on ajoute à l'hypochlorite de petites quantités de brome ou d'iode ou de leurs sels la réaction ne va pas au delà de l'acide gluconique. Il est ainsi possible d'effectuer l'oxydation sans employer d'hypobromites ou d'hypoïdites onéreux. Si la réaction se fait en présence d'un alcali libre il faut refroidir avec de la glace, si l'on opère en présence de carbonate de soude on effectue l'oxydation à une température de 45-55°.

Un brevet allemand opère de la façon suivante :

100 gr. de glucose dissous dans 200 cm³ d'eau additionnée de 5 gr. de bromure de sodium et de 5 gr. de carbonate de sodium — le tout est maintenu à une température de 50°. On ajoute un mélange de 50 gr. de carbonate de soude et de 25 gr. de carbonate de chaux de telle façon que la réaction carbonatée alcaline reste acquise. On fait passer un courant de chlore jusqu'à ce que la masse devienne limpide, c'est-à-dire que tout le carbonate de chaux soit dissous. Si la réaction est alors faiblement acide on neutralise exactement avec du carbonate de soude. Le gluconate de calcium cristallisera ensuite à froid. On le purifie par recristallisations successives.

Nous avons employé ce procédé pour oxyder du lactose qui se comporte exactement comme du glucose. L'opération a dû être continuée pendant dix-huit heures. Le générateur du chlore était une bombe à chlore liquide. Il est un point sur lequel nous insistons tout spécialement, c'est la nécessité de maintenir une alcalinité constante du milieu au moyen de carbonate de sodium sinon la réaction est nettement plus longue. Mieux vaut employer un excès de carbonate de sodium. Si l'on emploie

de la soude il faut refroidir énergiquement le mélange sinon on risquerait d'obtenir comme produit d'oxydation des corps autres que l'acide correspondant à l'aldose employé. L'opération est longue, 18 heures, pour ne plus avoir de pouvoir réducteur ; nécessite une surveillance continue pour éviter un dégagement de brome à partir du bromure, ce qui se produit lorsque le milieu devient acide. Enfin le corps obtenu est très impur et doit être purifié au prix de très grosses pertes.

L'agent oxydant peut encore être l'oxyde rouge de mercure au sein de l'eau de baryte. On obtient du gluconate de baryum insoluble que l'on peut transformer en gluconate de calcium.

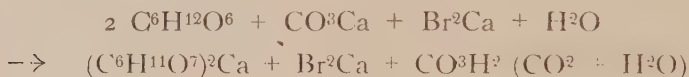
Ayant eu à notre disposition un gluconate de calcium fabriqué suivant cette méthode nous avons trouvé au cours d'essais de purification des traces de mercure métallique nettement visible sur le filtre qui nous avait servi à filtrer la solution aqueuse chaude du produit. La recherche des métaux lourds au cours des essais de la Pharmacopée ne nous avait pas permis de déceler la présence de ce mercure (plusieurs décigrammes) qui devait probablement se trouver à l'état métallique inclus dans certains amas de cristaux et non disséminé dans la totalité de l'échantillon. Ce gluconate de calcium n'était donc pas pur et donnait à l'injection intra-veineuse des accidents de choc.

Le gros inconvénient de ces procédés d'oxydation est la difficulté d'obtenir un produit pur car, d'une part, la séparation gluconate de calcium bromure de calcium est assez difficile et ne s'obtient qu'après de nombreuses cristallisations car ce produit s'oppose à la cristallisation du gluconate de calcium ; d'autre part, il y a toujours formation de produits secondaires dus à une oxydation plus ou moins brutale, et ces produits sont autant d'impuretés délicates à éliminer. Les procédés de préparation de gluconate de calcium par oxydation chimique ne sont pas à préconiser car ils fournissent un corps trop difficilement purifiable. On leur préfère les procédés d'oxydation par voie électrolytique.

METHODES ELECTROLYTIQUES

Le procédé est basé sur l'attaque d'une solution de glucose dans une cuve électrolytique en présence de bromure de calcium et de carbonate de calcium. L'électrolyse donne une formation de brome naissant à partir du bromure et ce brome oxyde le glucose en le transformant en acide gluconique, lui-même se réduisant en acide bromhydrique. L'acide gluconique agissant sur le carbonate de calcium donne du gluconate de calcium insoluble, tandis que l'acide bromhydrique régénère du bromure de calcium soluble qui entre à nouveau en réaction.

L'équation suivante schématise la réaction :



La majeure partie du gluconate de calcium cristallise rapidement vers la fin de l'électrolyse. Il peut être séparé par filtration et les eaux-mères additionnées de glucose et de carbonate de calcium peuvent servir pour une nouvelle opération. Ainsi une petite quantité de bromure peut oxyder une grande quantité d'aldose. La seule quantité de bromure perdue est celle qui souille le gluconate et l'on peut récupérer ce bromure dans les eaux-mères de cristallisation. Le gluconate de calcium obtenu doit être purifié par une série de cristallisations. Le produit ainsi purifié peut être employé à préparer des solutions injectables à la condition que les cristallisations aient été effectuées avec tout le soin désirable.

Au point de vue industriel la méthode est très intéressante d'abord à cause du rendement et ensuite à cause du prix de revient relativement bas du gluconate. La seule dépense importante outre le glucose est le courant électrique. Or, pour transformer une molécule de glucose en acide gluconique il faut un atome d'oxygène ou deux faradays en théorie. En pratique la quantité d'électricité nécessaire est assez voisine de ce chiffre. Ainsi 45 grammes de glucose (soit 1/4 de molécule) sont oxydés avec un rendement de 95 % par un demi faraday (13,4 ampères-heures). Ce fait prouve que la réaction d'oxyda-

tion du glucose en acide gluconique est la seule se produisant, car aucune réaction d'oxydation amenant la disparition d'une telle quantité de sucre réducteur ne nécessiterait une si petite quantité d'électricité.

Le prix de revient du courant électrique employé est relativement bas par rapport au prix de revient du chlore et du brome employés comme agents oxydants dans la méthode chimique.

Cette méthode très employée dans la pratique industrielle nécessite un appareillage spécial. Nous décrivons le plus simple qui est à l'origine de tous les autres et qui est celui d'Isbell.

APPAREIL D'ISELL.

C'est une cuve électrolytique très simple. Elle se compose de 2 électrodes adaptées à un ballon pyrex de 2 litres à col étroit qui est muni d'un agitateur mécanique. Les électrodes sont des cylindres de graphite de 22 mm de diamètre et assez longues pour atteindre le fond du ballon. Elles sont placées de part et d'autre du goulot du ballon tandis que l'agitateur est dans le goulot (voir figure 1).

La solution sucrée renfermant le bromure et le carbonate de calcium est placée dans le ballon et un courant continu traverse l'appareil.

Un potentiel de 15 volts donne un courant d'un peu plus de 0,5 ampère ou un courant d'une densité de 10 ampères par décimètre carré. Ce potentiel est bien supérieur à celui nécessaire pour l'oxydation, les pertes étant causées surtout par la résistance des électrodes et de la solution. La quantité d'électricité est mesurée par un ampèremètre en série avec la cuve à électrolyse. Lorsque la réaction est en marche, de l'hydrogène et du gaz carbonique se dégagent. La réaction du milieu n'est jamais acide à cause du carbonate de calcium et le liquide n'est pas coloré le brome étant absorbé dès sa libération. Des prélèvements sont effectués de temps en temps et le pouvoir réducteur du liquide est mesuré. La recherche du brome libre est effectuée avec des papiers à l'iodure de

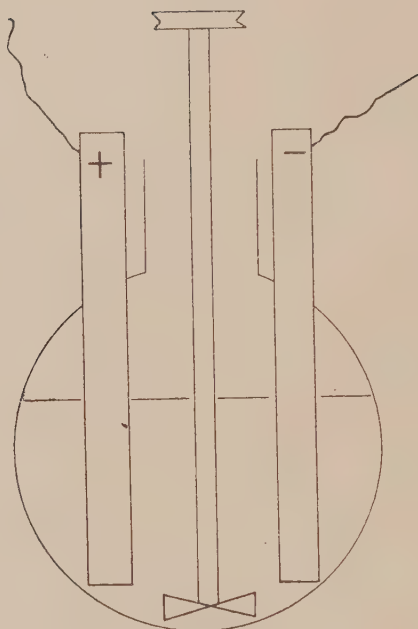


Figure 1
Appareil d'Isbell

potassium amidoné. Il n'y a pas de trace de brome libre jusque vers la fin de l'oxydation et à ce moment le pouvoir réductionnel de la solution est très affaibli. La fin de la réaction est directement décelable par l'apparition d'une teinte jaune due à du brome libre et ceci se produit lorsque la quantité théorique de courant à employer est légèrement dépassée. A ce moment la presque totalité du glucose est transformée en acide gluconique qui a donné du gluconate de calcium insoluble.

On peut aussi oxyder de même : lactose mannose, galactose, rhamnose.

Cas du glucose : 45 gr. de glucose anhydre (un quart de molécule), 8 gr. de bromure de calcium sont dissous dans eau q.s.p. 1 litre et additionnés de 25 gr. de carbonate de calcium. Un courant continu de 0,5 ampère est envoyé dans la cuve. Des prélèvements sont effectués de temps en temps et le pouvoir réducteur est déterminé.

La différence entre la quantité du glucose au début de l'opération et à n'importe quel moment donné est égale à la quantité de glucose oxydé. Si l'on trace la courbe représentant la quantité de glucose oxydé en fonction de la quantité d'électricité employée on a le résultat ci-contre (Tableau n° 2).

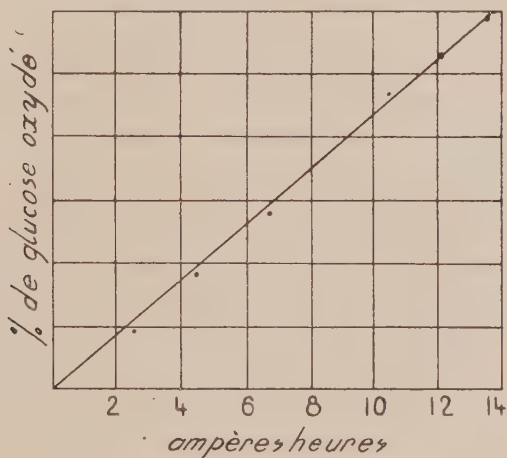


Tableau 2

La courbe est une droite. La quantité de glucose oxydé est proportionnelle à la quantité de courant employé et l'oxydation est virtuellement terminée lorsque la quantité théorique d'électricité a passé dans la cuve, soit 13,4 ampères-heure. Il n'y a pas de brome libre dans la cuve jusqu'à ce moment et ensuite on peut en décèler. Un excès de brome est rapidement absorbé par le gluconate de calcium et les solutions ne doivent pas être abandonnées plus de deux ou trois minutes après qu'elles ont donné un résultat positif à la recherche de brome libre.

On arrête le courant lorsque 96 % du sucre a été oxydé. On filtre et on concentre le filtrat. Le gluconate de calcium cristallise et on le sépare. On peut amorcer la cristallisation avec du gluconate de calcium pur. 45 gr. de glucose donnent environ 45 gr. de gluconate de calcium, ce qui correspond à un rendement de 57 %. Le bromure

de calcium des eaux-mères empêche partiellement la cristallisation du gluconate de calcium mais le sel n'ayant pas cristallisé peut être récupéré lors d'opérations ultérieures car les eaux-mères additionnées de glucose et de carbonate de calcium servent à effectuer une nouvelle oxydation. Si l'on veut cependant recueillir le maximum de gluconate de calcium on peut éliminer le bromure de calcium en le traitant avec de l'oxalate d'argent. Après filtration et évaporation du filtrat et amorçage de la cristallisation, on obtient une nouvelle quantité de gluconate. Ce sel doit être purifié par une ou deux cristallisations. Son emploi sous forme de soluté injectable est à surveiller et souvent il est nécessaire de le purifier avant de l'employer.

L'application industrielle de ce procédé a abouti à des appareils assez compliqués tel celui décrit dans *The Chemical Trade Journal and Chemical Engineer*, du 14 octobre 1938.

« La cuve est construite en bois de cyprès et munie d'un agitateur genre hélice à quatre palettes. Les cathodes et anodes (il y en a quatorze paires) sont en graphite et sont suspendues vers le haut du récipient. Le refroidissement est assuré avec des tubes de cuivre revêtus de tantale. La charge de la cuve se compose de 120 livres de glucose (glucose monohydrate), 15 livres de bromure de sodium pur et 30 livres de carbonate de calcium et d'eau en quantité suffisante pour un volume de 100 gallons (454 litres 59) ».

Le courant passe dans la cuve jusqu'à ce que la totalité du glucose soit oxydée et à la fin de l'opération le produit est abandonné à la cristallisation. Après enlèvement du gluconate la cuve est à nouveau remplie avec une nouvelle quantité de glucose et une nouvelle oxydation est mise en marche. Les cristaux de gluconate de calcium, après leur enlèvement, sont centrifugés et les eaux-mères sont remises dans la cuve avec la quantité de glucose et de bromure de sodium nécessaire pour remplacer celle perdue. D'après les auteurs cette cuve peut demeurer en travail plusieurs mois durant avec les

On utilise une densité de courant de 1,2 ampère par décimètre carré. Tout courant de densité inférieure à 1,0 ampère par décimètre carré ne s'effectue à une température voisine à 40°.

Dans cette même revue sont énumérés des emplois de l'acide gluconique, nous croyons intéressant de citer : l'acide gluconique est employé dans le tannage des cuirs, dans les lavages et dans le polissage des métaux, — la lactone est employée en boulangerie comme levure. Le gluconate d'aluminium sert au tannage, les gluconates solubles peuvent être utilisés pour stabiliser les émulsions et les mayonnaises. Le gluconate de fer est un tonique reconstituant, celui de magnésium est laxatif, celui de mercure peut remplacer en thérapeutique les autres sels de mercure. Un mélange de gluconate de cuivre et de fer peut avoir des applications dans le traitement de l'anémie. Enfin le radical glucono peut remplacer le radical acétyl dans des composés tels que l'acétamide, l'acétamido, la phénacétine. Nous rappelons l'emploi du gluconate de morphine qui a sur le chlorhydrate l'avantage d'agir plus lentement.

Autres appareils :

Un brevet allemand fait opérer avec l'appareillage suivant : Anode insoluble en graphite, cathode en cuivre, fer, plomb ou nickel, l'électrolyseur n'a pas de diaphragme. L'électrolyse s'effectue en présence d'un bromure ou d'un iodure soluble et d'un alcalin non électrolysable donc insoluble, tel que le carbonate de calcium, hydroxyde de calcium, hydroxyde d'aluminium.

Au cours d'essais d'électrolyse que nous avons suivis, l'appareil était formé d'un bécber de capacité suffisante, les électrodes étaient en graphite (20 mm de diamètre, distantes de 55 mm et plongeant de 100 mm). (Figure 2). Courant de 7 volts 5 et 0,6 ampère un agitateur mécanique brassait la masse. Le sucre oxydé était non du glucose mais du lactose.

Le bain était formé de :

Lactose	90 gr.
Bromure de calcium	8 gr.
Carbonate de calcium	25 gr.
Eau	Q. S. 1.000 cc.

L'électrolyse s'est poursuivie durant 32 heures à la température normale: Le liquide subissait un léger échauffement (température de 20° environ dans la cuve). Aucune coloration jaune ne fut visible au cours de l'essai. A l'arrêt du courant le liquide n'était absolument plus réducteur, et nous avons noté une polarisation des électrodes. A ce moment une légère coloration jaune était visible au voisinage des électrodes. Le dégagement de brome s'est poursuivi quelques minutes après l'arrêt du courant, et nous avons noté un voltage de 1,5 volt environ.

Le sel calcique obtenu étant très soluble dans l'eau, le liquide est filtré.

Le filtrat liquide est mis en glacière à une température de 5° environ en additionnant de chaux pure. On obtient une suspension dans laquelle on fait passer un courant de gaz carbonique. Il va se former du carbonate de calcium insoluble tandis que le lactobionate de calcium reste en solution.

Après filtration le liquide limpide est évaporé à basse température. Le résidu qui est essentiellement formé de lactobionate de calcium est lavé à l'alcool éthylique à 95°. Après plusieurs lavages et décantations on obtient une poudre blanche, c'est du lactobionate de calcium.

Caractères :

Poudre blanche — inodore — insipide.

Très soluble dans l'eau — donne une solution neutre.

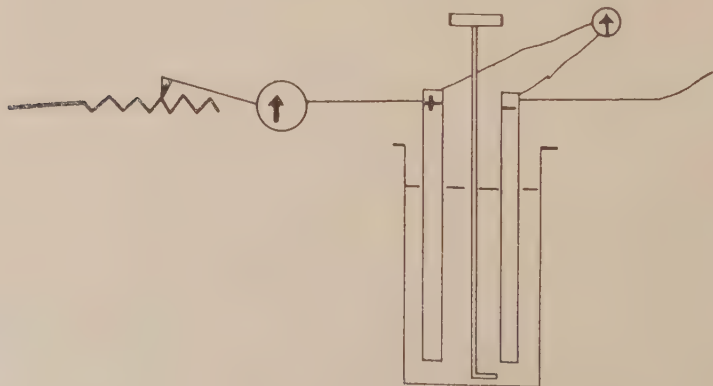


Figure (2)

METHODES BIOCHIMIQUES

‘ Nous allons maintenant examiner des méthodes d’oxydation du glucose appelées à un brillant avenir car les produits obtenus que nous avons eu l’occasion d’étudier et d’employer sont particulièrement purs.

Les microorganismes sont capables dans certaines conditions d’oxyder les aldéhydes ou les alcools pour donner des acides. On avait constaté que les glucides soumis à l’oxydation biologique donnent en plus des acides citrique, acétique oxalique, de petites quantités d’acide gluconique. Des recherches systématiques ont été entreprises pour obtenir en plus grosse quantité de l’acide gluconique. Tout d’abord on a cherché à isoler les microorganismes capables de produire de l’acide gluconique à partir du glucose. On a ainsi obtenu deux grands groupes de bactéries : le premier groupe donne à partir du glucose de l’acide gluconique et de l’acide citogluconique, le second donne seulement de l’acide gluconique selon F. Gstirner. Ce second groupe assemble le bactérium *industrium*, le bactérium *acetosum*, le bactérium *racens*, le bactérium *vinii acetati*, le bactérium *xyliuoides*, le bactérium *orleanense*, le bactérium *Hansen*, le bactérium *gluconicum*. Les bactéries étant aérobies il est nécessaire de les faire travailler en couche mince dans des bacs plats afin d’avoir un rendement suffisant. On voit alors se former en surface un voile analogue à celui donné par le micoderma *aceti* sur le vin se transformant en vinaigre. On peut soutirer le liquide et le remplacer par une solution nouvelle sans léser ce voile, ce qui permet de continuer longtemps l’opération. Chaque solution de glucose devra être stérile.

Applications industrielles :

Voici le mode opératoire préconisé par le brevet autrichien n° 127373 : On délaie dans un litre d’eau 70 gr. de levure fraîche, on porte doucement à l’ébullition et on continue la cuisson pendant une demi-heure. On laisse reposer 24 heures aux fins de décantation. Le liquide

clair décanté est stérilisé par tyndallisation à 100° en chauffant une demi-heure chaque fois. Cette eau levurée, étendue de trois fois son volume d'eau de source, servira de bouillon de culture. On fait un mélange de 150 gr. de glucose, de 30 gr. de carbonate de calcium dans un litre de bouillon de culture, on chauffe lentement jusqu'à ébullition, puis on verse dans des bacs stériles et on inocule avec des cultures de bactérium racens. On maintient à une température constante de 28°. Après quelques jours on remarquera une pellicule blanche s'étirant sur les parois des bacs. D'autre part, de grosses bulles remontant du fond seront un signe certain d'acidification. Pour dissoudre la majeure partie du carbonate de calcium il faudra 4 à 6 semaines. A ce moment on rassemble dans un seul récipient le liquide des bacs, on porte à l'ébullition, on filtre et on concentre le filtrat au bain-marie. En peu de temps se forme une masse cristalline brune que l'on sépare et lave à l'alcool dilué. Après une ou deux recristallisations (de préférence en additionnant de charbon animal) on obtient un produit blanc cristallisé qui est du gluconate de calcium pur. Le rendement est de 60 à 80 %. Pour éviter l'emploi de bacs on a essayé d'agrandir la surface du liquide sucré en faisant passer celui-ci dans un générateur cylindrique rempli d'une matière spongieuse inerte (coke, terre cuite poreuse) : c'est le cas du procédé américain, objet du brevet 1.896.811 de James N. Currie et Ralph H. Carter, en date du 31 janvier 1930.

Les bactéries employés appartiennent au groupe des acétobactéries : *b. oxydans*, *b. industrium*, *b. acetosum*, *b. acétigénium*, *b. acéti*, *b. xylinum* et *b. pasteurienum*. Par un distributeur approprié, la solution sucrée s'écoule sur la masse spongieuse remplissant un récipient cylindrique à fond perforé de façon que la solution d'acide gluconique puisse s'écouler dans un second récipient. La première solution sucrée est inoculée d'une culture appropriée appartenant au groupe ci-dessus. En même temps que le liquide s'écoule, une soufflerie d'air apporte l'oxygène nécessaire à la réaction et permet une division

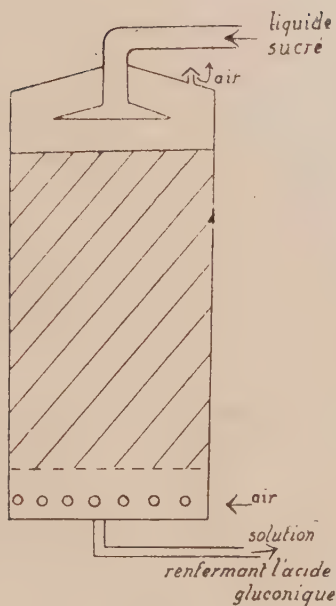


Figure 3

parfaite du liquide en fines gouttelettes. La température est maintenue de 15 à 35°, celle de 25° s'avérant la plus propice. Aussi longtemps que la culture se maintient pure dans le générateur, la fabrication peut être poursuivie. Il est intéressant d'avoir un générateur assez haut et étroit pour qu'un seul passage de la solution de glucose permette sa transformation en acide gluconique.

Un autre brevet américain n° 1.908.225, du 2 février 1931, de James N. Currie et Alexander Finlay, opère de la façon suivante : 1.500 gr. de glucose sont dissous dans 10 litres d'eau, on y ajoute un bouillon de culture (soit 150 gr. de sirop malté). Le tout est introduit dans un récipient muni d'un agitateur faisant 2.000 tours à la minute. On ajoute la culture de bactérie du groupe des acétobactéries et on enclanche l'agitateur qui produit une mousse abondante, la température étant maintenue à 30-40°. En 48 à 60 heures, 90 à 95 % du glucose sera oxydé en acide gluconique, le rendement étant augmenté par addition d'alcalins. La formation de mousse pourra être favorisée par apport de saponine.

Un progrès a été obtenu lorsqu'on a employé comme agent d'oxydation le *b. oxydans* et le *b. industrium*. Ces micro-organismes peuvent en effet effectuer l'oxydation en couche profonde et en pH acide (jusqu'à 2). Cet abaissement du pH est un avantage considérable qui écarte tout risque de contamination secondaire.

Cette importante acquisition fait l'objet du brevet allemand n° 556.731, du 15 août 1932, qui donne tout d'abord le mode opératoire pour l'obtention d'une culture de *b. oxydans* se développant dans les meilleures conditions. Pour cela un milieu de culture contenant 10 % de sucre d'amidon additionné de sels nutritifs et d'acide acétique à concurrence de pH = 2,5 estensemencé avec du *b. oxydans*. Dès que l'opalescence du liquide indiquera la croissance des bactéries, on l'incorporera à un ballon de culture contenant 200 cm³ de la même solution. Après incubation de 2 à 3 jours à une température de 25 à 30° et alors que la moitié du sucre sera converti les bactéries seront dans leur stade optimum de croissance. Par agitations répétées on s'opposera à la tendance des bactéries de se fixer à la surface. Après le temps indiqué on incorporera le contenu du ballon à une cuve de 4 litres remplie du même mélange, on laissera la fermentation se faire comme précédemment et on continuera ensuite à la même cadence en ajoutant la culture optimum au mélange glucosé. Comme il n'est pas possible d'agiter des cuves on homogénéisera le liquide en brassant avec une spatule en bois. Il sera indiqué, surtout au début, c'est-à-dire au stade d'accoutumance à la privation progressive de l'oxygène, d'introduire à l'occasion de l'air ou de l'oxygène dans la cuve. On isolera de la grande cuve de cette série de culture une couche de bactéries et on recommencera la culture de la même façon en restreignant petit à petit l'adduction d'oxygène dans les cuves. Les bactéries ainsi cultivées gardent leur propriété de croissance en milieu homogène et peuvent être réaccoutumées à ce genre de croissance par des passages successifs en milieu de moins en moins oxygénés. C'est là un fait très intéressant de

modification des conditions de vie par accoutumance dont les applications pratiques sont de première importance.

Ces cultures servent à ensemer une solution renfermant 10 gr. de phosphate de potassium, 50 gr. de levure par litre et un kilo de glucose pour 10 litres d'eau. On stérilise rapidement et on ajoute la culture de *b. oxydans* préparée et l'acide acétique Qsp pH 2,5. Après 9 à 10 jours de fermentation à 30° on obtient de l'acide gluconique à raison de 97 % du poids sec de sucre employé.

Ce procédé est très intéressant et mérite de retenir l'attention, il ne nécessite aucun appareillage compliqué, il est à l'abri de toute contamination du fait du pH bas où travaillent les bactéries, ce qui est une grande sécurité ; enfin, il procure un gain de temps appréciable tant dans la manipulation des récipients que dans leur lavage. Quant au rendement il est des meilleurs, 95 à 99 % et même 100 %.

Nous allons maintenant étudier des procédés d'oxydation biologique du glucose mettant en œuvre des champignons. Dans le groupe des champignons filiformes le *penicillium citrinum*, le *P. divaricatum* et *P. luteum* montrent une aptitude spécifique pour transformer en acide gluconique, glucose, amidon, ou saccharose. Pour obtenir de l'acide gluconique on prépare une solution aqueuse de sucre ou une dilution d'amidon à laquelle on ajoute une solution nutritive et des alcalins pour neutraliser l'acide gluconique. On stérilise le tout et après refroidissement on inocule les spores des *penicilliums*. Après 12 à 30 jours l'oxydation sera terminée selon la concentration, en glucide et la sorte de spore employée.

On soutire la solution en laissant intacte la couche de champignons en surface et on introduit dans le récipient une nouvelle solution sucrée. De cette façon le mycelium pourra servir plusieurs fois. On récolte l'acide gluconique en procédant à l'évaporation de la solution après l'avoir filtrée ou en neutralisant au carbonate de calcium

en filtrant à chaud et en évaporant ou enfin par précipitation à l'alcool.

Le brevet américain 1.726.067, de T. Herrick et O. E. May, du 27 août 1929, donne les exemples suivants :

I

Volume de la solution	1 l.
Champignon utilisé	P. Luteum purpurogenum
Temps	14 jours
Glucose	200 gr.
Azotate de sodium	1 gr.
Sulfate de Magnésium crist.	0 gr. 50
Chlorure de potassium	0 gr. 10
Phosphate mono acide de potassium	0 gr. 10
Acide recueilli sous forme de gluconate de calcium	132 gr.

II

Cet exemple prouve que le mycelium a la possibilité d'oxyder une seconde charge de solution sucrée après l'achèvement d'une première oxydation. Aucun sel nutritif n'est nécessaire.

Volume de solution	850 cm ³
Champignon utilisé	P. luteum, purpurogum
Temps	7 jours
Glucose	160 gr.
Acide recueilli sous forme de gluconate de calcium	146 gr.

Les auteurs affirment que le rendement est excellent et que le produit obtenu est particulièrement pur.

Un autre brevet américain n° 1.849.050 attire l'attention sur le fait que le développement de certains champignons filiformes *Aspergillus niger*, *Sterygmatozystis nigra* par exemple et l'oxydation du glucose se font dans des conditions opposées, cette dernière freinant le développement des spores. C'est pourquoi l'auteur indique un procédé en deux temps :

Premier temps : culture dans les meilleures conditions possibles sur bon bouillon.

Deuxième temps : introduction de cette culture lors de

son développement maximum dans le récipient contenant la solution sucrée.

Le bouillon de culture se compose de : sucre de canne 10 %, peptone 0,15 %, biphosphate de potassium 0,10 %, sulfate de magnésium 0,05 %, chlorure de calcium 0,10 %. A une température de 30° il se formera, 4 ou 5 jours après l'ensemencement, une couche de champignons.

Le second bouillon contient environ 20 % de glucose ou de saccharose et une quantité correspondante d'alcalins pour neutraliser l'acide gluconique, un léger excès d'alcalin ne peut que favoriser la réaction.

Après 4 à 5 jours à la température de 25 à 30°, le sucre employé sera converti en gluconate de calcium dans la proportion de 70 à 80 %. On soutire le liquide, on porte à l'ébullition et on filtre. Une partie du gluconate se déposera en refroidissant, le reste sera précipité à l'alcool.

Nous n'avons pu mettre en œuvre d'oxydation par voie biochimique, n'ayant pu nous procurer de souche pure de bactérie. Cependant, grâce à l'obligeance d'un industriel lyonnais qui met actuellement au point un procédé semblable, nous avons eu entre les mains divers échantillons de gluconate de calcium fabriqué par voie biochimique. Ces échantillons soumis aux essais de la Pharmacopée française se sont montrés particulièrement purs. Ils donnent en particulier des solutions aqueuses concentrées absolument limpides.

Nous avons ensuite employé ce gluconate de calcium sous forme de soluté injectable à 10 % en ampoules de 5 cm³.

Les solutions obtenues sont absolument incolores et ne donnent aucun accident à l'injection intra-veineuse, ce qui prouve que nous avons affaire à un produit d'excellente qualité.

CONCLUSION.

Les procédés d'oxydation du glucose par voie chimique ne sont pas à recommander car ils donnent un produit très difficilement purifiable et le gluconate de calcium obtenu ainsi doit être réservé à l'emploi par voie

buccale à l'exclusion de toute voie parentérale à moins de purification poussée, ce qui augmente considérablement le prix de revient du produit à cause des pertes très élevées au cours des diverses cristallisations.

Plus intéressantes sont les méthodes d'oxydation par voie électrolytique. Le gluconate de calcium ainsi obtenu est assez pur à condition de partir de glucose officinal. Cependant, comme les préparations industrielles se font essentiellement à partir de glucose massé, il est nécessaire de surveiller attentivement la purification du produit. Si ce gluconate est destiné à être employé sous forme de soluté injectable, mieux vaut parachever sa purification par une ou deux cristallisations supplémentaires. Actuellement les méthodes électrolytiques sont assez employées pour la préparation industrielle du gluconate de calcium. Le rendement est intéressant, le produit obtenu est assez pur pour être employé par voie buccale, mais nous faisons des réserves quant à son emploi sous contrôle par voie parentérale.

Le troisième groupe de procédés est celui auquel nous donnons la préférence. La préparation du gluconate de calcium par voie biochimique s'effectue déjà industriellement à l'étranger. Nous avons appris avec plaisir qu'un laboratoire lyonnais était en train de mettre au point cette fabrication en France et c'est à son aimable Directeur que nous devons d'avoir pu étudier les échantillons de gluconate de calcium fabriqués selon ce procédé.

Les produits, obtenus sont remarquablement purs et peuvent être employés par voie parentérale sans aucune purification et les procédés d'oxydation par voie biochimique sont les seuls capables de donner un tel produit.

Le seul inconvénient de ces méthodes était le risque de contamination des cultures par d'autres microorganismes, risque définitivement écarté si l'on emploie la méthode où le b. oxydans travaille aux environs de pH 3. Nous ne pouvons que souhaiter voir se généraliser ce procédé de fabrication tant en France qu'à l'étranger.

ESSAIS PHYSIOLOGIQUES
ET ESSAIS TOXICOLOGIQUES
ESSAIS PHYSIOLOGIQUES

Ils ont été effectués sur des chiens chloralosés (0 gr. 12 par kilog).

Ont été enregistrés lors de l'injection intra-veineuse :

- la pression artérielle au moyen du manomètre de Ludwig ;
- les mouvements de l'intestin *in situ* : méthode du ballon ;
- les mouvements respiratoires : pneumographe de Paul Bert.

Les quantités de soluté injectable de gluconate de calcium à 10 % ont varié de 1 cc à 2 cc par kilogramme d'animal.

Voici quelques protocoles expérimentaux :

a) *Gluconate de calcium du commerce soluté à 10 % avec 1 % de camphosulfonate de soude.*

Chien de 11 kg 500 :

1 cc de soluté par kg :

Pression artérielle : légère baisse.

Intestin : arrêt des mouvements.

1 cc 5 de soluté par kg :

Pression artérielle : légère hausse, fugace puis légère baisse plus durable.

Intestin : arrêt des mouvements.

b) *Gluconate de calcium 10 %, borate de soude 1 %.*

Chien de 7 kg :

1 cc de soluté par kg :

Pression artérielle : légère baisse, puis légère hausse et normale.

Intestin : diminution, puis augmentation durable du tonus et des mouvements.

Respiration : rien.

1 cc 5 de soluté par kg :

Pression artérielle : légère hausse.

Intestin : arrêt, puis reprise lente.

Respiration : rien.

c) *Gluconate de calcium pur préparé par voie bio-chimique soluté 10 %.*

Chien de 6 kg 500 :

1 cc de soluté par kg :

Pression artérielle : légère hausse.

Intestin : arrêt.

Respiration : très légère accélération.

d) *Gluconate de calcium impur (résidu de purification soluté à 10 %).*

Chien de 7 kg :

1 cc de soluté par kg :

Pression artérielle : brachycardie accentuée.

Intestin : arrêt.

Respiration : légère accélération.

e) *Gluconate de calcium impur (ayant donné des accidents).*

Chien de 6 kg 500 :

1 cc de soluté par kg :

Pression artérielle : légère et fugace hypertension.

Intestin : diminution du tonus et des mouvements et retour.

Respiration : arrêt, puis reprise sans augmentation.

1 cc 5 de soluté par kg :

Pression artérielle : légère hausse, puis chute verticale et mort de l'animal.

Intestin :

Rein : constriction.

Respiration : forte diminution, légère accélération de retour — arrêt — mort.

f) *Essai successif de divers échantillons sur un même animal.*

Chien de 3 kg 500 :

Gluconate de calcium pur à 10 % (biochimique).

2 cc de soluté par kg :

Pression artérielle : chute transitoire et retour.

Intestin : diminution du tonus et mouvements.

Respiration : diminution, puis augmentation.

Gluconate de calcium du commerce 10 % et borate de soude 1 %.

2 cc de soluté par kg :

Pression artérielle : légère élévation.

Intestin : arrêt.

Respiration : légère stimulation.

Gluconate de calcium purifié 10 % et camphosulfonate de soude 1 %.

1 cc de soluté par kg :

Pression artérielle : légère élévation.

Intestin : arrêt.

Respiration : légère apnée, puis stimulation.

1 cc 5 de soluté par kg :

Pression artérielle : légère hausse, puis baisse.

Intestin : stimulation du tonus et des mouvements.

Respiration : stimulation.

Les troubles physiologiques les plus accentués ont été donnés par les produits impurs et nous remarquons que le gluconate provoquant des accidents de choc chez les humains a été le seul à tuer un chien à dose de 1 cc 5 de soluté à 10 % par kilogramme d'animal.

ESSAIS TOXICOLOGIQUES

A) Sur les poissons : *Gambusia holbrooki* d'un poids de 0 gr. 10 environ.

Appareil : Celui décrit dans la thèse de médecine, Paris 1922, par Lopez-Lomba.

Un ballon de 60 cc environ contient :

Eau du robinet	25 cc
Solution de sels biliaires à 12 %	II gouttes
Solution de carbonate de soude à 1 %	II gouttes
Produit à essayer (solution à 10%)	10 gouttes
Poisson	I

Les ballons sont plongés dans un bain d'eau à température constante (20°) réglée par un thermostat.

On opère sur plusieurs séries de ballons en faisant varier dans chaque série la quantité de produit à essayer.

Au bout de 24 heures on compte les animaux morts dans chaque série.

Résultats : ils sont donnés par le tableau suivant :

TABLEAU N° 3

..

Nombre de gouttes de soluté à 18 g/l. de gluconate	Nombre de poissons par série	Gluconate biochimique donne morts	Gluconate purifié donne morts	Gluconate impur donne morts
XV	4	0		1
XVII	4	0		0
XXI	18	2	0	5
XXII	4	1	0	0
XXV	12	0	3	3
Total	42	3	3	9

Observations : Le produit le plus toxique est incontestablement le gluconate donnant des accidents en clinique humaine.

B) Sur les grenouilles : *Rana agilis* d'un poids de 4 à 7 gr.

Mode opératoire : on injecte un soluté à 10 % de gluconate de calcium à essayer dans le sac lymphatique dorsal de l'animal. On note le nombre d'animaux morts au bout de 24 heures.

Résultats :

TABLEAU N° 4

Nombre de centimètres cubes de soluté à 10 % injecté	Nombre de Grenouilles	Gluconate purifié donne mort à	Gluconate impur donne mort
5/10	5	0	2
6/10	14	4	3
Total	19	4	5

Observations : Les résultats sont moins nets que ceux enregistrés avec les poissons. Si nous tenons compte des erreurs expérimentales, il ne nous est pas possible de juger de la toxicité relative des deux échantillons vis-à-vis de *Rana agilis*.

Conclusions : Ces essais physiologiques et ces essais de toxicité ne permettent donc pas de juger de façon certaine de la qualité d'un gluconate de calcium.

Signalons cependant que le gluconate préparé par voie biochimique est, comme en clinique humaine, celui qui donne le moins d'incidents ou d'accidents.

SOLUTE INJECTABLE DE GLUCONATE DE CALCIUM

Nous rappelons tout d'abord qu'afin d'éviter toute cause d'erreur, nous nous sommes uniquement servis d'ampoules en verre blanc, neutre, les récipients que l'on trouve actuellement dans le commerce étant généralement plus ou moins alcalins.

La solution aqueuse à 10 % de sel à une molécule d'eau employée normalement en injection est saturée et cristallise rapidement à l'air. L'adjonction de stabilisants serait donc une nécessité si l'on veut obtenir une préparation se conservant bien. Le plus employé des stabilisants est l'acide borique ou ses sels de sodium ou de calcium.

Acide borique ou borates agents stabilisants.

A la dose de 1 % d'acide borique cristallisé ou de 1 à 1,25 % de borate de sodium, on obtient aisément une solution à 10 % de gluconate de calcium qui se maintient stable et qui peut être stérilisée par tyndallisation à 100° en ayant soin de ne pas dépasser cette température (Traité de pharmacie chimique de Lebeau et Courtois).

D'après Galdoni, en s'aidant de ces corps, on peut obtenir des solutions aqueuses de gluconate de calcium très concentrés (jusqu'à 57 %).

L'étude de l'isotherme de solubilité à 20° du système : $(C^6H^{13}O_7)^2Ca, B^2O^3, 11H^2O$ a été faite par de Carli et il a constaté que l'acide borique augmente notablement la solubilité du gluconate de calcium.

Ceci serait dû à la formation d'un composé du type : $(C^6H^{11}O_7)^2Ca, B^2O^3, x H^2O$. Il y a certainement combinaison chimique entre le gluconate de calcium et l'acide borique avec formation d'un corps différent du gluconate de calcium au point de vue cristallin, corps qui est beaucoup plus soluble dans l'eau que le gluconate de calcium. Les raisons qui motivent l'emploi du gluconate de calcium comme sel calcique injectable ne sont peut-être pas applicables à ce complexe chimique.

D'autres inconvénients sont encore à signaler. L'un, d'ordre pratique ; impossibilité de stériliser à plus de 100° le soluté stabilisé, car à une température plus élevée le gluconate de calcium peut s'altérer, ainsi que l'ont signalé de Carli et L. Sollazo. Cette altération se traduit à l'injection intra-veineuse par des phénomènes de choc moins dramatiques que ceux dus aux impuretés de préparation du gluconate de calcium, mais donnant des hyperthermies de plusieurs heures atteignant 40° et même 41 .

Dans une conférence faite le 16 juin 1933, devant la Société Chimique de France, à propos de la configuration des polyalcools déduite de leur influence sur le pouvoir conducteur de l'acide borique, le chimiste danois Bøseken a dit : « Il y a plus de quarante ans que Magnanini, dans le laboratoire de Wilhelm Oswald, a montré qu'il faut attribuer la cause de l'action acidifiante du mélange polyalcool borate de soude à la formation de combinaisons facilement dissociables ». Nous insistons sur le fait de la facile dissociation des combinaisons polyols acide borique. Un autre inconvénient est que cette combinaison donne à la solution un pH acide. A cela rien d'étonnant puisque l'acide gluconique est un mono-acide penta-alcool qui va se comporter exactement comme le plus employé des polyols, la glycérine. Pour ramener à la neutralité 10 cm^3 d'une solution aqueuse de gluconate de calcium à 10 % renfermant 1 % de borate de sodium, il faut 5 cm^3 2 de solution N/10 de soude en présence de phénolphtaleïne, comme indication, coloré. C'est d'ailleurs exactement la quantité de soude exigée, par la théorie, dans le dosage de 0 gr. 10 de borate de sodium par la méthode en présence de glycérine, méthode adoptée par la Pharmacopée française pour le dosage du borate de sodium.

Il est à signaler que l'acidité de la solution est proportionnelle à la quantité de borate de sodium jusqu'à une concentration de ce corps inférieure à 3 %, au-dessus de cette concentration le mélange tend à devenir alcalin et

pour une concentration de 5 % de borate de sodium et 10 % de gluconate de calcium, la solution est alcaline.

Si l'on chauffe le mélange gluconate de calcium 10 % borate de sodium 1 % à 100-110°, comme on le fait au cours de la stérilisation de soluté injectable, ce n'est plus 5 cm³ de soude N/10 qui sont nécessaires à la neutralisation, mais 12 cm³, ce qui montre qu'il y a décomposition du complexe polyol borate avec formation de produits acides.

Nous avons mesuré le pH de certains solutés de gluconate de calcium ainsi stabilisé et vendu dans le commerce. Les chiffres obtenus varient de 4,5 à pH 6 et pour amener à pH 7 de telles ampoules de 10 cm³ il a fallu 11 cm³ 30 de soude N/10.

Nous avons réuni dans le tableau suivant les résultats enregistrés dans les mesures du pH de divers solutés injectables de gluconate de calcium, mesures faites colorimétriquement :

TABLEAU N° 5

Calcium C. (spécialité) pH 6,8	ne choque pas
Calcium S (spécialité) pH 6,4	ne choque pas
Calcium T (spécialité) pH 7,6	ne choque pas
Gluconate de calcium A pH 4,6	choque
Gluconate de calcium B pH 5,4	choque
Gluconate de calcium L pH 4,2 à 3,2	choque

Les solutés de gluconate de calcium A et L sont stabilisés avec un composé du bore (recherche de cet élément positive dans les deux cas).

Nous signalerons simplement que pour obtenir un virage de la phanolphthaleïne il faut 0 cm³ 40 de soude N/10 avec le soluté de calcium C (une ampoule de 10 cm³) alors que pour le gluconate de calcium A, 12 cm³ sont nécessaires.

En résumé, l'addition d'acide borique ou de borate à une solution de gluconate de calcium abaisse le pH

d'abord par formation d'un complexe défini du type $(C^6H^{11}O_7)_2Ca, B^2O_3, x H^2O$ phénomène classique dû aux fonctions alcools du gluconate et ensuite après chauffage à une température élevée le pH est encore abaissé par suite de la décomposition de ce complexe. Ceci conduit donc à rejeter définitivement l'acide borique et les borates comme stabilisants des solutés injectables de gluconate de calcium car il y a non seulement modification de la composition chimique de gluconate de calcium mais le soluté obtenu n'est pas à proprement parler un soluté de gluconate de calcium et son activité thérapeutique n'est peut-être pas la même que celle d'un soluté de gluconate de calcium pur. D'autre part le pH, c'est-à-dire une des constantes physico-chimiques importantes de soluté, est considérablement modifié et cet abaissement de pH n'est peut-être pas une qualité requise pour un soluté récalcifiant. C'est pour cela que l'acide borique et les borates solubles ne sont pas à préconiser comme stabilisants de solutés injectables de gluconate de calcium.

Autres stabilisants :

Chlorure de magnésium, aux doses de 5 à 10 %, il stabiliserait les solutés injectables de gluconate de calcium. Si ce sel n'amène pas de variation de pH, il introduit une quantité importante de produit non actif et le chlorure de magnésium n'est donc pas à recommander.

Sont encore employés : le phosphate mono-sodique, l'hexaméthylène tétramine, le bromure de calcium et le mannonate de calcium, mais leur efficacité est plus ou moins démontrée.

Essais personnels.

Nous avons essayé divers produits appartenant à la chimie minérale ou à la chimie organique. La seule condition que nous leur ayons demandé de remplir c'est d'être des corps couramment employés en thérapeutique et autant que possible par voie parentérale.

Camphosulfonate de sodium.

Employé à la concentration de 1 %, il donne un soluté de pH 6,7 après stérilisation à 110°. Ne peut donner de choc et pourrait même prévenir ceux dus à l'introduction d'une solution saturée dans l'organisme.

Nous avons préparé une première fois 150 ampoules de 5 cm³ et une deuxième fois 275 ampoules de 5 cm³ et 75 ampoules de 10 cm³ de soluté à 10 % de gluconate de calcium et 1 % de camphosulfonate de sodium. La stérilisation a été effectuée à l'autoclave à 110°. Pendant les 15 premiers jours suivant la stérilisation ces ampoules ont été conservées à la glacière, puis ensuite à température normale.

A la sortie de la glacière, 2 ampoules de 5 cc³ sur 273 avaient donné un dépôt cristallisé et 4 de 10 cc³, aucune nouvelle ampoule a subi d'altération à température normale ; mais toute ampoule brisée ou filée donne une cristallisation.

TABLEAU N° 6

	Après stérilisation	Après 15 jours à la glacière	Après 45 jours à température normale
Ampoules de 5 cc lipides	275	273	273
Ampoules de 10 cc lipides	75	71	71

Ce soluté a un pH de 6,8, il est normal. Son emploi par voie intra-veineuse ne donne lieu à aucun accident.

Camphosulfonate de calcium.

N'ayant eu à notre disposition qu'une très petite quantité de ce produit, nous n'avons pu faire de nombreux essais. La solubilité du camphosulfonate de calcium dans l'eau est plus élevée que celle du gluconate de calcium. Une solution à 20 % de camphosulfonate de calcium est très stable, aussi a-t-on préconisé ce corps en remplacement du gluconate de calcium. A concentration égale les solutions de camphosulfonate de calcium sont moins

riches en calcium que celles de gluconate. Le camphosulfonate de calcium renferme 7,38 % de son poids de calcium alors que le gluconate en renferme 8,94 %.

Un soluté renfermant 5 % de gluconate de calcium et 5 % de camphosulfonate se conserve bien, même en récipient non clos et non stérilisé. Une soluté renfermant 15 à 20 % de camphosulfonate de calcium et 5 % de gluconate se conserve absolument limpide à l'air libre. L'association de ces deux sels de calcium présente donc un réel intérêt, mais la concentration en gluconate ne doit pas excéder 5 %.

L'injection d'un soluté de camphosulfonate de calcium pur ou du mélange camphosulfonate gluconate ne donne lieu à aucun accident.

Hyposulfite de magnésium.

Employé à la concentration de 1 %, donne un soluté stable après stérilisation à 110°, mais au bout de quelques mois, on note un dépôt floconneux qui disparaît par chauffage à 100°.

Le soluté stérilisé de gluconate de calcium 10 % hyposulfite de magnésium 1 % a un pH de 6,8 et ne donne aucun accident à l'emploi.

Toute ampoule filée ou brisée laisse apparaître un dépôt cristallin.

Glycéro-phosphate de sodium.

Soluté renfermant 10 % de gluconate de calcium et 1 % de glycérphosphate de sodium. Stérilisation à l'autoclave à 110°.

Essai effectué sur 100 ampoules de 5 cm³ et 30 ampoules de 10 cm³.

pH après stérilisation = 7,4 : soluté limpide.

Conservation : 15 jours à la glacière : aucune altération ; à température normale ensuite : 1 ampoule de 5 cm³ donne un dépôt cristallin.

Glycérophosphate de calcium.

Employé à la concentration de 1 % donne un soluté limpide. Stérilisation à 110°.

Essai effectué : 80 ampoules de 10 cc.

pH après stérilisation : 7,4.

Conservation : 15 jours à la glacière, puis à température ordinaire.

Aucune ampoule ne s'altère.

Toute ampoule dont la pointe est brisée donne une cristallisation du gluconate de calcium.

Hypophosphite de calcium.

Ce corps est probablement employé quoique nous n'ayons pas obtenu des preuves certaines de son emploi.

Employé à la concentration de 1 % : Stérilisation du soluté à 110°.

Essai sur 80 ampoules de 10 cc :

pH après stérilisation = 5,8.

Conservation : 15 jours à la glacière : 14 ampoules donnent des précipités ; ensuite à température normale, d'autres ampoules cristallisent.

Remarques : Les ampoules demeurées limpides laissent voir une suspension de microcristaux, particulièrement si on les examine à la lumière solaire ; cette suspension peut donner un léger dépôt si les ampoules sont laissées quelques jours au repos. Nous avons noté un phénomène semblable avec des ampoules d'un soluté spécialisé vendu couramment dans le commerce.

L'hypophosphite de calcium, s'il est de préparation ancienne, peut devenir acide et communiquer cette acidité au soluté qui peut avoir un pH de 4,6 à 5 de ce fait.

L'altération par cristallisation de nombreuses ampoules doit être essentiellement imputée à une déficience des récipients, la porosité dont nous parlerons par la suite.

Saccharate de calcium.

Employé aux USA à la concentration de 0,50 %, donne un soluté ayant un pH 6,2 après stérilisation. Soluté se conservant très bien en milieu clos, mais toute ampoule ouverte donne un précipité de gluconate de calcium.

Il est à noter que la formation de ce précipité est moins rapide cependant qu'avec un soluté pur de gluconate de calcium.

Comment agissent ces corps et ont-ils en fait une efficacité certaine ?

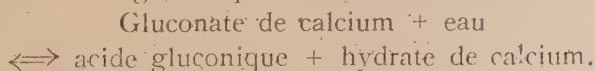
Nous pouvons dire que le borate de sodium forme avec le gluconate de calcium un complexe ayant une forme cristalline toute différente que celle du gluconate. Le corps est nettement plus soluble dans l'eau que le gluconate mais malheureusement il a en solution aqueuse un pH trop acide et d'autre part son activité thérapeutique n'est peut-être pas semblable à celle du gluconate.

Quant aux autres corps ils peuvent intervenir en retardant la cristallisation du gluconate de calcium, c'est le cas du bromure de calcium, ainsi que nous l'avons vu à propos de la préparation par voie électrolytique du gluconate de calcium. Le bromure de calcium a été et peut être employé pour stabiliser le soluté de gluconate de calcium. Les autres sels de calcium (glycérophosphate, hypophosphite) ont peut-être une action analogue.

Les autres corps préconisés ou ceux dont nous avons fait l'essai n'ont probablement aucune activité, car toute ampoule dont la pointe est brisée donne rapidement un abondant dépôt cristallin. Il serait d'ailleurs assez extraordinaire qu'ils aient une efficacité quelconque. Au cas où ils formeraient un complexe plus soluble, ce corps ne pourrait plus être considéré comme du gluconate de calcium ce qui restreindrait l'emploi en thérapeutique de ce nouveau composé.

Essai de préparation sans stabilisant.

Nous avons signalé, à propos de la purification du gluconate de calcium, une série de chauffages successifs des solutés qui facilitent et augmentent la solubilité de ce produit dans l'eau. Une très faible partie du gluconate de calcium est probablement hydrolysée avec libération d'acide gluconique selon la réaction :



Si la réaction se produit en milieu clos et stérile un équilibre sera atteint dans le sens $\rightarrow$ équilibre qui assurera la stabilité du soluté saturé.

Après avoir effectué la dissolution à chaud, nous filtrons le soluté. Cette opération a un rôle primordial dans la préparation de tout soluté injectable et plus particulièrement dans le cas présent. En effet une seule filtration sur papier introduit souvent dans la solution des fibres de cellulose. Ces fibres invisibles au moment de la préparation du soluté se recouvrent peu à peu d'une couche du produit en solution et sont visibles au bout de quelques semaines.

Dans le cas du gluconate de calcium, les fibres jouant le rôle d'amorce de cristallisation favorisent et activent ce phénomène. Il convient donc d'éliminer soigneusement ces impuretés :

soit par plusieurs filtrations successives sur le même papier,

soit par filtration sur bougie ou sur plaque poreuse avec un appareillage approprié.

Nous avons même dans certains essais associé les deux procédés de filtration de tous les solutés additionnés ou non de stabilisants.

Le soluté soigneusement filtré est mis rapidement en ampoules de 5 cm³ et 10 cm³ par remplissage à la cloche à vide, les ampoules sont scellées aussitôt et stérilisées à l'autoclave à 110° immédiatement après. Nous insistons sur la nécessité d'aboutir rapidement à la stérilisation des ampoules, car la cristallisation du gluconate peut être amorcée au cours du remplissage ou avant la fermeture des ampoules. Elle peut aussi se produire après la fermeture des ampoules si on ne les stérilise pas rapidement. C'est pour cette raison que l'on a conseillé de conserver les ampoules scellées non stérilisées dans un B. M. de 60-70° jusqu'à leur stérilisation.

En effet, nous avons vu une série de plusieurs centaines d'ampoules totalement cristallisées pour ne pas avoir été stérilisées dans les 24 heures suivant leur fermeture. D'ailleurs nous avons proposé de les soumettre à trois stérilisations successives et le gluconate de calcium a été redissout. Cependant le soluté obtenu n'était pas d'une limpidité parfaite,

Si l'on effectue une seule stérilisation, la majeure partie des ampoules demeureront limpides, ainsi que le prouvent les chiffres suivants.

TABLEAU N° 7

	après stérilisation	après 15 jours à la glacière	après 15 jours à température normale
Ampoules de 10 cc ³ limpides			
40	40	37	37
Ampoules de 5 cc ³ limpides			
275	272 + 3 vides	254	254

Les ampoules ayant cristallisé redeviennent limpides après une ou deux nouvelles stérilisations à 110° à l'autoclave et le demeurent.

Nous proposons donc le mode opératoire suivant qui nous a donné d'excellents résultats :

Dissolution à chaud du gluconate de calcium dans l'eau distillée, filtration du soluté chaud sur papier de bonne qualité, recommencer trois fois ou filtrer deux ou trois fois sur bougie ou plaque poreuse, remplissage rapide des ampoules, les sceller immédiatement après et les stériliser à 110° à l'autoclave dans l'heure suivant leur fermeture ; 24 heures après, stériliser à nouveau à l'autoclave à 110° ; 24 ou 48 heures après, 3^e et dernière stérilisation à 110° (cette stérilisation n'est pas absolument indispensable).

Le soluté ainsi préparé est limpide, se conserve de façon excellente sauf pour les ampoules cassées ou fêlées, il y a pH de 6,8 et ne donne aucun accident à l'emploi à la condition d'avoir été préparé avec un produit de bonne qualité. Au cours de l'hiver nous avons exposé des ampoules de soluté de gluconate de calcium ainsi préparées à un froid intense, le liquide s'est totalement pris en masse et les ampoules mises à une température de 15 à 16° ont redonné un soluté absolument limpide et

qui l'était encore six mois après sa congélation et son dégel. Ceci prouve que nous avons affaire à un soluté stable, du moins en milieu hermétiquement clos, car toute ampoule fêlée ou brisée à la pointe donne un dépôt cristallin abondant.

REMARQUES ET OBSERVATIONS

A la suite de nos essais nous pouvons donc dire qu'il est possible d'obtenir une solution aqueuse à 10 % de gluconate de calcium parfaitement stable, soit en employant des stabilisants qui sont efficaces dans la mesure où ils donnent, avec le gluconate de calcium, une combinaison chimique et pour quelques-uns de ces stabilisants la formation d'une combinaison chimique nouvelle n'est pas sans inconvénient, soit en opérant dans des conditions telles que l'équilibre instable du soluté est maintenu tant que le milieu demeure stérile et hermétiquement clos.

Les corps employés comme stabilisants doivent répondre à un certain nombre de conditions, entr'autres :

ne pas avoir de toxicité aux doses où on les emploie, être normalement employés ou employables sous forme de soluté injectable.

Nous avons vu qu'il est possible d'obtenir un soluté stable simplement en effectuant trois stérilisations successives sans aide d'aucun stabilisant et c'est à ce procédé que nous donnons la préférence.

En ce qui concerne la verrerie à employer trois points sont d'importance :

- 1° étanchéité ;
- 2° neutralité ;
- 3° forme de l'ampoule.

Etanchéité des ampoules : Il existe des ampoules qui ne sont pas absolument étanches. Un défaut dans la fermeture de la ou des pointes ne peuvent permettre une bonne conservation du soluté injectable de gluconate de calcium. En effet, l'équilibre stable acquis grâce à une série de stérilisation ne pourra demeurer que si le réci-

pient est parfaitement étanche. C'est à des ampoules non étanches qu'il faut probablement imputer ces cristallisations tardives que l'on constate dans certains lots d'ampoules de soluté de gluconate de calcium.

La vérification de l'étanchéité se fait au moyen d'une solution de bleu de méthylène dans laquelle on met les ampoules remplies et scellées. Si la fermeture des récipients n'a pas été faite avec soin, après chauffage de la solution colorée et refroidissement en présence des ampoules complètement immergées, une partie de celles-ci ont leur contenu coloré en bleu. L'étanchéité parfaite des ampoules est une condition indispensable à la conservation de ce soluté, donc la fermeture des ampoules doit être effectuée avec beaucoup de soins et vérifiée.

Neutralité : elle est nécessaire. Tout verre alcalin risque d'entraîner une précipitation d'hydroxyde de calcium à partir du gluconate et c'est là une amorce possible de cristallisation, donc d'altération du soluté.

Nous ne pensons pas que c'est à l'alcalinité des verres qu'il faut imputer les accidents qui ont été constatés lors de l'emploi de solutés injectables de gluconate de calcium. Ainsi que nous l'avons montré la qualité du gluconate de calcium est seule à mettre en cause.

Forme des récipients : aux ampoules courantes, il faut préférer les ampoules forme bouteille à une seule pointe et à fond plat.

Il y a à cela plusieurs raisons. D'abord, toute pointe d'ampoule est fragile, donc susceptible de se briser, surtout pour les ampoules de 10 cc³ et plus. Pour diminuer la fragilité des pointes, on coupe celles-ci assez près de la partie renflée du récipient, si bien que lors de la fermeture on crée des zones de surchauffe dans le liquide. Ceci peut amener une évaporation du solvant et une précipitation du corps en solution, surtout lorsque ce corps est peu soluble, comme c'est le cas du gluconate de calcium. Cette précipitation peut être l'amorce d'une cristallisation qui va se poursuivre et rendre le soluté inutilisable. Nous n'insistons pas sur les risques de rup-

ture qu'entraîne la proximité du liquide froid et de la pointe portée au rouge.

La pointe des ampoules forme bouteille est plus longue mais de plus gros diamètre et donc moins fragile que celle des ampoules ordinaires.

L'élimination de toute trace de soluté de la pointe ouverte de l'ampoule avant sa fermeture est une opération indispensable à effectuer, sinon il y aura soit dépôt de gluconate de calcium à l'intérieur de la pointe et ce sera l'amorce de la cristallisation du soluté gluconate, soit carbonisation du gluconate et finalement le dépôt carboné se trouvera en suspension dans le soluté et pourra ainsi amorcer la cristallisation du gluconate. Mais les ampoules de forme bouteille ont en général une pointe de diamètre uniforme et relativement large si bien qu'elles ne retiennent pas le liquide alors que la pointe ouverte des ampoules courantes de diamètre assez étroit fonctionne comme un tube capillaire et retient une partie du soluté dont l'élimination totale est assez difficile. Seules les ampoules de forme bouteille peuvent être remplies et scellées automatiquement au cours d'une même opération, ce qui, dans le cas du soluté de gluconate de calcium, est d'un gros intérêt.

Enfin, au cours de la stérilisation à l'autoclave, les ampoules ordinaires, quelle que soit leur position, ont une de leur pointe au moins qui renferme du soluté. Le volume de ce soluté étant de moindre importance que celui contenu dans l'ampoule, il sera surchauffé et risque de se sursaturer en gluconate de calcium. Or, c'est précisément ce liquide sursaturé qui va se refroidir le plus rapidement ensuite. Ceci peut entraîner la précipitation d'une partie du gluconate de calcium dans une des pointes de l'ampoule et finalement amorcer la cristallisation de tout le gluconate contenu dans l'ampoule. Cette dernière sera alors inutilisable.

Les ampoules forme bouteille peuvent être stérilisées posées sur leur fond plat. Aucune zone de surchauffe ne peut alors exister, la pointe de l'ampoule ne renfermant absolument pas de soluté. Il n'y aura donc aucun risque

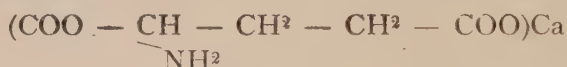
C'est le sel de calcium de l'acide glucohexite citrique qui résulte de l'estérification d'une fonction acide de l'acide citrique par une fonction alcool primaire du glucohexite.

C'est un corps blanc, renfermant 8 % de calcium.

Il est très soluble dans l'eau et est employé en Allemagne sous le nom déposé de Selvoral.

Glutamate de calcium.

C'est le dérivé d'aminé du glutarate de calcium, sa formule est



Il est employé en Allemagne sous le nom de calcium Hamberg, sous forme de soluté injectable.

Camsulphosulfonate de calcium.

C'est le sel de calcium de l'acide camphosulfonique préparé par sulfonation du camphre naturel ou synthétique. Le sel de sodium de cet acide est un corps très soluble dans l'eau qui permet de préparer des solutés injectables remplaçant avantageusement l'huile camphrée, car il a toutes les propriétés pharmacodynamiques du camphre. Le camphosulfonate de calcium est un corps microcristallin, blanc, de saveur amère très soluble dans l'eau.

Avec ce corps nous avons préparé des solutés à 10 % et à 20 % qui sont particulièrement stables.

L'emploi en clinique humaine de ces solutés ne nous a pas donné de résultats aussi nets et rapides que ceux enregistrés avec des solutés de gluconate de calcium pur à 10 %.

La conservation du soluté est parfaite, le camphosulfonate de calcium étant très soluble dans l'eau.

Nous avons ensuite préparé des solutés mixtes renfermant du gluconate et du camphosulfonate de calcium qui se conservent parfaitement à la condition que la concentration en gluconate ne dépasse pas 4 % environ, c'est-à-dire le maximum de solubilité du gluconate de calcium dans l'eau à température ordinaire.

On a substitué aux solutions à 10 % de gluconate de calcium des solutés titrant 4 à 5 % de gluconate de calcium réellement dissout et dont le titre exprimé en gluconate est complété à 10 ou 20 % avec un sel organique de calcium soluble et non toxique.

Cependant l'emploi du gluconate de calcium est motivé en calcithérapie par voie parentérale ainsi que nous l'avons vu au début de ce travail. Il vaut donc mieux, à notre avis, l'employer en solutions pures qui se conservent parfaitement si la préparation a été effectuée convenablement, que de l'associer à d'autres sels de calcium très solubles mais peut-être moins actifs au point de vue thérapeutique. Nous en avons la preuve d'après les résultats cliniques que nous avons personnellement observés à l'Hôpital Civil de Grenoble au cours de l'emploi de solutés purs de camphosulfonate de calcium à la place de solutés purs de gluconate de calcium.

CONCLUSIONS

Au terme de cette étude sur le gluconate de calcium et la préparation des solutés injectables de ce corps, nous nous efforcerons de tirer des conclusions ayant un intérêt pratique.

Gluconate de calcium.

Nous insistons sur la nécessité d'avoir un gluconate de calcium pur pour la préparation des solutés injectables.

Les essais de la Pharmacopée Française ne sont pas suffisants pour affirmer qu'un gluconate de calcium officinal puisse être employé par voie parentérale.

Un des caractères organoleptiques important du gluconate de calcium pur : c'est sa blancheur. Tout gluconate de calcium qui n'est pas parfaitement blanc et ne donne pas un soluté aqueux concentré incolore ne doit pas être employé par voie parentérale.

La méthode de dosage adoptée par la Pharmacopée peut être avantageusement remplacée par un dosage polarimétrique à la condition d'augmenter le pouvoir rotatoire du gluconate de calcium par l'adjonction de corps tels que : l'azotate de bismuth, l'acétate d'urane, ou le molybdate d'ammonium. Une solution titrée de MnO_4^-K permet un dosage volumétrique rapide du gluconate de calcium.

Le seul procédé de préparation permettant d'obtenir un gluconate de calcium pur et non choquant est la voie d'oxydation biochimique. Le gluconate de calcium préparé par voie électrolytique risque de donner des solutés injectables provoquant des accidents. Il est indispensable de le purifier par recristallisations. Quant au gluconate de calcium préparé par oxydation chimique il est prudent de le réserver à l'emploi par voie buccale.

Lorsqu'un gluconate de calcium dont le procédé de préparation est inconnu doit servir à préparer des solutés injectables, il serait bon qu'un essai d'activité physiologique et un essai de toxicité fut effectué sur divers animaux avec ce produit en se servant comme test de

comparaison d'un gluconate de calcium pur préparé par voie biochimique.

Les résultats enregistrés, quoique non absolument définitifs permettraient de juger la toxicité relative du produit vis-à-vis des animaux d'épreuve employés et conditionneraient son acceptation ou son rejet pour l'emploi par voie parentérale.

Solutés injectables.

Le gluconate de calcium n'est pas soluble dans l'eau à température ordinaire à la concentration de 10 %. Cependant il est possible d'obtenir un soluté aqueux sursaturé stable en milieu clos et stérile en s'aidant de procédés divers.

L'adjonction au soluté de produits chimiques jouant le rôle de stabilisants ne semble pas avoir donné de résultats concluants sauf s'il y a formation de composés chimiques nouveaux n'ayant plus les caractères de solubilité du gluconate de calcium mais risquant aussi de ne plus avoir les avantages thérapeutiques de ce sel de calcium.

Parmi les stabilisants à proscrire nous citons ceux qui modifient le p^H du soluté et tout particulièrement l'acide borique et les borates solubles qui donnent avec le gluconate de calcium une combinaison chimique se traduisant par la formation d'un corps certes très soluble dans l'eau mais qui donne une solution à p^H 3,5. Un tel soluté ne peut avoir une activité thérapeutique comparable à celle d'un soluté de gluconate de calcium pur dont le p^H varie de 6 à 7. D'autre part il n'est peut-être pas très indiqué de faire de la calcithérapie au moyen de soluté injectable particulièrement acide.

Le procédé le plus recommandable est celui qui consiste à stabiliser le soluté par plusieurs stérilisations à 110° à l'autoclave. Il va s'en dire que le verre des ampoules doit être de bonne qualité et tout particulièrement neutre.

La forme des ampoules joue un rôle dans la conservation du soluté. Nous avons souvent constaté que dans les ampoules courantes à deux pointes renfermant du soluté de gluconate de calcium à 10 % l'amorce de la cristallisation se fait au voisinage de l'extrémité de ses pointes. Nous préconisons donc l'emploi d'ampoules forme bouteille à une seule pointe qui ont l'avantage d'être remplies et fermées automatiquement avec grande rapidité. Ces opérations s'effectuant dans les meilleures conditions de propreté grâce à des machines conçues à cet effet.

Nous insistons une fois encore sur la nécessité d'éliminer toute amorce de cristallisation, d'où le rôle primordial de la filtration du soluté en ne pas oubliant que toute filtration sur papier entraîne des fibres cellulosiques et nécessite donc plusieurs passages sur le même papier. La filtration sur bougie ou sur plaque poreuse ne présente pas cet inconvénient et est donc à préconiser. Enfin la mise en ampoules d'un soluté injectable de gluconate de calcium étant une opération délicate ainsi que la fermeture de ces ampoules, seul un appareillage effectuant automatiquement, c'est-à-dire exactement, proprement et rapidement ces deux opérations peut donner toute sécurité. C'est dire que la préparation d'un soluté injectable de gluconate de calcium est du domaine de la seule industrie pharmaceutique et seuls des laboratoires spécialisés sont à même de préparer cette forme pharmaceutique — du moins un produit donnant toute satisfaction.

Lu et approuvé

L. VIGNOLI

Vu et permis d'imprimer

Aix, le 15 Octobre 1946

Pour le Recteur

Le Doyen délégué

Vu et approuvé

Pour le Doyen

L'Assesseur

Jean ROCHE

BIBLIOGRAPHIE

- ALVAREZ FERNANDEZ. — *Med. Iberica*, t. 2. 1-4, 4 juillet 1936.
- BALDACIU. — *Archive de pharmacologie*, 62-91-107, sept. 36.
- BASEKIN. — *Bull. soc. chim. franc.*, 1933, t. 53, p. 1332-36.
- BONNOT G. — *Thèse doctorat pharmacie*, Nancy, 1927.
- CARLI (de). — *Ann. chim. applic.*, t. 21, p. 447, 1931 (C.I., t. 28, p. 378, 1932).
- Chimie Fabrick Vonn Sandoz*, E. P., 395-296 (C.I., t. 31, p. 623, 1934).
- DELMAS MARSALET. — *La Presse médicale*, n° 15, 1932.
- GORIS-LIOT et A. GORIS. — *Traité de pharmacie galénique*, 2° éd. 1942, t. 1, p. 749.
- GUALDONI. — *Boll. chim. farm.*, 1932, t. 1, p. 45 (B.S. P., mai 1933, p. 305).
- GSTIRNER F. — *Chim. Zeitung*, 21 janv. 1942, e 66, p. 31-33.
- Herzfeld Liebig An.*, t. 245, p. 27, 1888.
- ISELL et FRUSH. — *Bureau Stand j. res*, 1931, t. 6, p. 1145.
- Kayser Hirztl Fortbildg*, n° 13, 1934.
- LEBEAU et COURTOIS. — *Traité de la pharmacie chimique*, 2° éd., t. 1, p. 1028 et 1161.
- LOPEZ LOMBA. — *Thèse Médecine*, Paris, 1922.
- LUMIÈRE et BRUN. — *Soc. Biologie*, t. 118, p. 1453-1935, et *Soc. biol.*, Lyon, 18 mars 1935.
- MONTERO. — *Rev. flum. de Med.*, 4, 227-230, mai 1939.
- Pauzani Science Farmac.*, t. 71, p. 45, 1932.
- Pharmacopée Française*, t. 2, p. 139 et 6° éd., 1937.
- PERRET R. — *Thèse de Nancy*, P. 1930, p. 230.
- PINCASS H. — *Ph. Zintra*, t. 73, p. 469, 1932.
- Presse Médicale*, n° 5, p. 61, 3 février 1945.
- ROTHLIN. — *Journal suisse de médecine*, n° 17, 1927.
- SANDOZ. — *Pharm. Acta Helve*, t. 10, p. 114, 1935.
- SOLLAZO. — *Scienc. farm.*, 1933, t. 1, p. 109 (C. I. 1934, t. 31, p. 623).
- The Chemical Trade journal and chemical engineer*, 14 oct. 1938, p. 342-43.
- Tsermark All. Physio*, 1916, t. 1, p. 120.
- WILLEMIN et LUCIANI. — *Les Sciences médicales*, 10 mars 1932.

.....
Raoul BESSOUD
⌘ ÉDITEUR ⌘
24, Cours Berriat, 24
G R E N O B L E
.....

